



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Departamento de Botânica
Pós-graduação em Botânica

**PROTEÔMICA *SHOTGUN* E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR
EM GENÓTIPOS DE PALMA DE ÓLEO (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*)
CONTRASTANTES QUANTO A AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA
EMBRIOGÊNICA**

Aluna: Daiane Gonzaga Ribeiro
Orientador: Jonny Everson Scherwinski-Pereira
Co-orientadora: Angela Mehta dos Reis

Brasília – DF
Junho/2017

Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Departamento de Botânica
Pós-graduação em Botânica

**PROTEÔMICA *SHOTGUN* E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR
EM GENÓTIPOS DE PALMA DE ÓLEO (*Elaeis oleifera* x *E. guineensis*)
CONTRASTANTES QUANTO A AQUISIÇÃO DA COMPETÊNCIA
EMBRIOGÊNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Botânica da Universidade de
Brasília como requisito à obtenção do título de
Mestre em Botânica

Daiane Gonzaga Ribeiro

Brasília – DF
Junho/2017

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existência. Não se pode deixar de ficar admirado quando contempla os mistérios da eternidade, da vida, da maravilhosa estrutura da realidade. Basta que se busque compreender um pouco desse mistério a cada dia. Nunca perca a curiosidade.... Não pare de se maravilhar.”
Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus primeiramente, que me deu saúde, paz e sabedoria para realizar esse grande sonho. Enquanto houver amor e fé nunca caminharemos sozinhos, por isso, é com muito amor que glorifico ao Senhor pela conquista do meu Mestrado.

Aos meus queridos pais Elisa e Diomar e aos meus irmãos que nunca hesitaram em me ajudar, pelo apoio e pela dedicação ao cuidar dos meus sonhos junto comigo.

Ao meu marido Antoni William pelo apoio e compreensão durante esse processo, principalmente pela paciência comigo em alguns momentos de estresse e preocupação.

Aos meus orientadores: Dr. Jonny Jonny Everson Scherwinski-Pereira e a Dra. Angela Mehta pela confiança e pela oportunidade de fazer parte da equipe deles além de acreditarem no potencial do meu trabalho. Agradeço a todos os meus professores, pois, cada um deles me influenciaram de uma forma especial e contribuíram de maneira única pelo meu sucesso profissional.

Aos meus amigos e companheiros dos laboratórios: Genômica e Proteômica (LGP) e Cultura de Tecidos (LTC) que sempre estiveram à disposição quando as dúvidas surgiram, eu os agradeço pela atenção e dedicação em me ajudar. Muito obrigada a todos vocês!

Aos colaboradores do laboratório de Bioquímica de Proteínas da Universidade de Brasília, especialmente ao Professor Dr. Wagner Fontes pelo enorme auxílio nas análises de proteômica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de Brasília. Aos colaboradores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (EMBRAPA).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa durante o período do mestrado.

RESUMO

A palma de óleo é uma planta oleaginosa de relevante importância econômica, pois os seus frutos são ricos em óleo vegetal. A espécie possui um único meristema apical e não apresenta formas convencionais de propagação vegetativa, sendo a propagação realizada apenas por sementes. Desta forma, o método mais utilizado para a propagação vegetativa da palma de óleo é a embriogênese somática (ES). Entretanto há relativamente poucos trabalhos que mostram a expressão de proteínas relacionadas a esse processo. O objetivo do presente estudo foi identificar as proteínas diferencialmente abundantes entre genótipos de palma de óleo contrastantes quanto à aquisição de competência embriogênica, por meio da proteômica *Shotgun*, além de avaliar a expressão de genes candidatos envolvidos nesse processo por RT-qPCR. Foram utilizadas folhas aclorofiladas de dois genótipos obtidos do cruzamento interespecífico entre *Elaeis oleifera* x *E. guineensis*, contrastantes ao processo embriogênico. O material foi coletado em triplicata biológica nos tempos 14 e 90 dias durante a etapa de indução de calos em cada genótipo. Proteínas totais foram extraídas com fenol e precipitadas com acetato de amônio em metanol. Para análise LC-MS/MS, as proteínas extraídas foram analisadas no equipamento ESI- LC-MS/MS (*Thermo Scientific*). A análise de dados foi realizada por meio do software *Progenesis® QI for proteomics (Nonlinear Dynamics)* e a identificação das proteínas por meio do software *Peaks® (Bioinformatics Solutions)*. Posteriormente a expressão dos genes (proteínas) candidatos foram avaliadas por RT-qPCR. O estudo revelou no estágio inicial um total de 2177 proteínas, sendo 130 diferencialmente abundantes. Já no estágio intermediário, foram identificadas 2518 proteínas, sendo 97 diferencialmente abundantes. Na análise de expressão gênica 14 genes que codificam as proteínas candidatas foram avaliados. De acordo com os resultados obtidos pode-se destacar que o controle do estresse e a regulação do ciclo celular são processos indispensáveis para o sucesso do desenvolvimento embriogênico. Portanto, sugere-se como potenciais biomarcadores da aquisição de competência embriogênica proteínas antioxidantes que foram aumentadas no genótipo responsivo, como a peroxidase 12, a 1-Cys peroxirredoxina e glutathione-S-transferase, proteínas envolvidas na divisão celular como a proteína associada a microtúbulos, a proteína 14-3-3 e a proteína patellin-3-like, além de proteínas envolvidas na via de ubiquitinação como a Plant UBX domain-containing protein e 26S proteasome regulatory subunit.

Palavras-chave: Competência embriogênica, LC-MS/MS, proteômica *Shotgun*, RT-qPCR.

ABSTRACT

Oil palm is an oleaginous plant of relevant economic importance since its fruits are rich in vegetable oil. The species has a single apical meristem and does not have conventional forms of vegetative propagation, so propagation is carried out only by seeds. Currently, the only method used for vegetative propagation of oil palm is somatic embryogenesis (SE). The aim of this study was to identify differentially abundant proteins from oil palm genotypes contrasting in the capacity of embryogenic competence acquisition, using Shotgun proteomics, besides evaluating the expression of candidate genes by qRT-PCR. Oil palm leaves were submitted to callus induction. The material was collected in biological triplicates at 14 and 90 days during callus induction (DDI) in each genotype. Total proteins were extracted with phenol and precipitated with ammonium acetate in methanol. For LC-MS/MS analysis, the proteins were solubilized with ammonium bicarbonate and digested with trypsin. The peptide mixture was injected into the ESI-LC-MS/MS (Thermo Scientific) equipment. Data analysis was performed using *Progenesis*® QI (Nonlinear Dynamics) and *Peaks*® (Bioinformatics Solutions). The expression of candidate genes encoding the proteins identified was performed by qRT-PCR. The study revealed a total of 4695 proteins. Responsive and non-responsive genotypes were compared at 14 and 90 DDI and revealed 227 differentially abundant proteins. In the gene expression analysis 14 genes encoding the candidate proteins were evaluated. The data analysis revealed several proteins mainly related to energy metabolism, stress response and regulation of cell cycle, which seem important for a successful embryogenic development. We suggest some proteins as potential biomarkers for the acquisition of embryogenic competence, including antioxidant proteins that have been increased in the responsive genotype, such as peroxidase 12, 1-Cys peroxiredoxin and glutathione-S-transferase. Proteins involved in cell division also seem important, such as the protein associated with microtubules, the 14-3-3 protein and the patellin-3-like protein. Proteins involved in the ubiquitination pathway, such as Plant UBX domain-containing protein and 26S proteasome regulatory subunit may also be key factors in the success of callus formation in oil palm.

Keywords: Embryogenic competence, LC-MS/MS, *Shotgun* proteomics, qRT-PCR.